IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DES LIPOIDSTOFFWECHSELS IN NEBENNIEREN VON RATTEN NACH ACTH-BEHANDLUNG

1972

Margot Groenewolt
aus
Breitbrunn / Ammersee

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DES LIPOIDSTOFFWECHSELS IN NEBENNIEREN VON RATTEN NACH ACTH-BEHANDLUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Margot Groenewolt
aus Breitbrunn am Ammersee

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. D. Eberhagen

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Seitz

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.7.72

UNIV. LEIDEN BIBL.

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet

Herrn Privatdozenten Dr. D. Eberhagen danke ich sehr für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch der medizinisch-technischen Assistentin Fräulein G. Plette, deren praktische Hilfe mir sehr wertvoll war.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546017_0091

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	
Das Verhalten des Cholesterins und seiner Ester	1
Die Regulation der Cholesterinsynthese	2
Problemstellung und Zielsetzung	4
Beschreibung der Versuche	
Vorbereitung der Tiere	5
Inkubation der Nebennieren	5
Gewinnung und Reinigung der Gesamtlipoide	6
Bestimmung der spezifischen Radioaktivität	6
Reagenzien	7
Ergebnisse	8
Tabellen	11
Abbildungen	14
Diskussion	21
Zusammenfassung	26
Literaturverzeichnis	27

EINLEITUNG

Das Verhalten des Cholesterins und seiner Ester

1909 isolierten und identifizierten Rosenheim und Tebb (1) die wichtigsten Lipoidkomponenten der Nebenniere, wobei sie den charakteristisch hohen Gehalt an Cholesterin, das zum größten Teil in Esterform vorliegt, feststellten.

Wie erstmals der Arbeitskreis um Hechter 1951 (2) gezeigt hat, kann das Cholesterin von der Nebenniere zum Aufbau der Steroidhormone verwendet werden, so daß die Annahme naheliegt, daß das Organ sich gewissermaßen dadurch ein Depot an Stoffwechselvorläufern anlegt, um im Bedarfsfall rascher die Kortikoidsekretion erfolgen zu lassen.

Dagegen glauben Cushman und Mitarbeiter (1964), gestützt auf ihre Perfusionsversuche an isolierten Hundenebennieren, eher an eine de novo-Synthese der Rindenhormone aus Acetat, die unabhängig ist von Cholesterinvorräten (3).

Stress oder die Verabreichung von ACTH führen zu einer Erhöhung der Syntheserate und Sekretion der Steroidhormone durch die Nebenniere. Wie sich durch Gabe des Hypophysenhormons an Ratten zeigen ließ, steht der Cholesteringehalt der Nebennieren in enger Beziehung zum ACTH-Spiegel des Blutes und damit zur Corticoidsekretion (4).

Popjak gelang 1944 der Nachweis, daß für die experimentell erzeugten Schwankungen des Gesamtcholesteringehaltes in der Nebenniere speziell die Cholesterinester verantwortlich sind und der Gehalt an freiem Cholesterin bemerkenswert konstant bleibt (5). Demnach schien es möglich, die Ester als die eigentlichen Ausgangsstoffe der Hormonsynthese anzusehen (6,7).

Dailey und Mitarbeiter (1960-1963) fanden, daß bei der Inkubation mit Nebennierenhomogenat vor allem das mit ungesättigten Fettsäuren veresterte ^{14}C-Cholesterin in markierte Kortikoide umgesetzt wird (8,9,10,11). Japanische Autoren halten so das Cholesterinarachidonat für den eigentlichen Vorläufer der Nebennierenrindenhormone (12,13).

Andere Versuche mit Rattennebennieren (1964,1966) von Peron und Ichii deuten darauf hin, daß zum Teil das freie Cholesterin der Mitochondrien zur Hormonsynthese herangezogen wird (14,15).

Die erwähnten Untersuchungen von Dailey und Mitarbeiter (9,10) hatten aber auch ergeben, daß in Hundenebennieren freies Cholesterin zwar in Cholesterinester und in Steroide eingebaut wird, daß andererseits aber bei der Inkubation von einigen organcharakteristischen Cholesterinestern mit markiertem Cholesterinanteil die Aktivität sowohl in den Steroiden als auch im freien Cholesterin wiedergefunden wurde. Demnach könnte der Syntheseweg durchaus auch ohne Mitbeteiligung der Cholesterinester direkt vom freien Cholesterin aus erfolgen.

Die Regulation der Cholesterinsynthese

Bereits vor etwa 20 Jahren, als über Zwischenprodukte der Cholesterinsynthese noch wenig bekannt war, wurden die ersten Phänomene entdeckt, die zeigten, daß die Geschwindigkeit der Cholesterinbildung aus Acetat nicht konstant zu sein braucht, sondern von äußeren Faktoren beeinflußt werden kann. Die meisten Arbeiten über die Beeinflussung des Cholesterinstoffwechsels wurden an der Leber, insbesondere an der Rattenleber, durchgeführt.

Die ersten Faktoren, deren Bedeutung für die Regulation der Cholesterinsynthese erkannt wurden, waren der Cholesteringehalt der Nahrung (16) und Nahrungsentzug (17). Etwa gleichzeitig wurde offenbar, daß sich möglicherweise auch Hormone an der Steuerung der Cholesterinsynthese beteiligen (18). Der enge Zusammenhang zwischen Cholesterinspiegel der Nebenniere und ACTH-Produktion lassen vermuten, daß das Hormon der Hypophyse nicht nur die Synthese der Kortikoide beeinflußt sondern auch die ihrer Vorläufer, d.h. des Cholesterins.

Erst die Entdeckung der Mevalonsäure im Folkersschen Arbeitskreis (19) und der Nachweis ihres bevorzugten Einbaus in Cholesterin (20) gab den Einblick in die Bildungsweise der Terpene und Steroide aus Hydroxymethyl-glutaryl-CoA frei. Mevalonsäure wird durch Reduktion von Hydroxymethylglutaryl-CoA an der Thioestergruppe gebildet; das Enzym, welches diese Reaktion katalysiert, ist die HMG-CoA-Reduktase. Das Gleichgewicht der Reduktasereaktion liegt praktisch vollständig auf der Seite der Mevalonsäure.

Über den regulierenden Einfluß des Cholesterins auf seine Synthese wurden viele Untersuchungen angestellt. Cholesterinfütterung senkt die Geschwindigkeit der hepatischen Cholesterinsynthese aus Acetat in vivo ind in vitro stark, wie Versuche an Kaninchen und Hunden (21), Ratten (22,23,24-26), Hühnern (27) und beim Menschen (28) ergaben.

Hemmt Cholesterin seine eigene Synthese, so sollte dieser Effekt durch Entfernen von Cholesterin aus dem Körper abgeschwächt werden können. Swell und Mitarbeiter (1957) konnten dies auch zeigen (29). Die Leber reagiert mit einem Anstieg der Geschwindigkeit der Cholesterinsynthese, so als sei ein Inhibitor entfernt worden. Siperstein zeigte, daß Zu- und Abnahme der Geschwindigkeit der Cholesterinsynthese durch Bestrahlung, Fasten oder Cholesterinfütterung durch Anerungen der Aktivität der HMG-CoA-

Reduktase herbeigeführt werden (30). Der Ort der negativen feedback-Regulation der Cholesterinsynthese würde demnach also bei der Umwandlung von HMG in Mevalonat liegen. Auch Lynen (1966) hält die HMG-CoA-Reduktase für das physiologische Kontrollenzym der Cholesterinsynthese (31). Daß dabei möglicherweise auch noch andere Enzyme eine Rolle spielen, zeigen Versuche Buchers 1959 (32) und Goulds 1967 (33). Auf diese Problematik soll später noch eingegangen werden.

Problemstellung und Zielsetzung

In Stress-Situationen wird von der Hypophyse das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) ausgeschüttet, das in der Nebenniere die Sekretion der Rindenhormone anregt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Stress durch Applikation von exogenem ACTH an der Ratte nachgeahmt und das Verhalten der Nebenniere in Bezug auf Cholesterinester und freies Cholesterin studiert. Dabei stellten sich folgende Fragen:

1. Wie verändern sich der Cholesterin- und Cholesterinestergehalt der Nebennieren nach Applikation von 10 IE ACTH? Lassen sich daraus Schlüsse ziehen, welche der beiden Substanzen als direkter Vorläufer der Corticoidsynthese in Frage kommt?

2. Die meisten Untersuchungen über die Regulierbarkeit der Cholesterinsynthese wurden bisher an der Leber gemacht. Welche möglichen Regulationsmechanismen lassen sich im Vergleich dazu an der Nebenniere erkennen?

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Vorbereitung der Tiere

Für die Versuche wurden weibliche Sprague-Dawley Ratten der gleichen Zucht mit einem durchschnittlichen Körpergewicht zwischen 110 und 170 g verwendet. Die Ratten waren unter identischen Bedingungen aufgewachsen und erhielten eine Standarddiät (Altromin-Futter) ad libitum. Für die Versuche wurden jeweils acht Tiere, die ungefähr gleich schwer waren, ausgewählt. Den Versuchstieren wurde in verschiedenen Zeitabständen jeweils 10 IE ACTH, entsprechend 0,5 ml Lösung intraperitoneal injiziert. Bei den einzelnen Versuchsreihen wurden außerdem die Nebennieren von jeweils 8 Kontrolltieren, die keine Injektion erhielten, in gleicher Weise wie jene der Versuchstiere weiterverarbeitet. Alle Tiere wurden durch Eröffnen des Herzmuskels in Äthernarkose getötet.

Inkubation der Nebennieren

Nachdem der Herzmuskel eröffnet und die Tiere ausgeblutet waren, wurden sofort die Nebennieren entnommen und von anhaftendem Fettgewebe freipräpariert. Weil die Organe sehr klein waren, konnte die bindegewebige Kapsel nicht entfernt werden. Anschließend wurde das Organfrischgewicht jeweils beider Organe einer Ratte auf einer Halbmikrowaage bestimmt. Zur Inkubation mit 2-^{14}C-Mevalonat wurden die Organe in Warburg-Gefäße überführt, mit einer Schere geviertelt und mit je 2 ml eisgekühltem Krebs-Ringer-Puffer mit einem 5%igen Humanalbuminzusatz versetzt. Außerdem wurde 1 /^{u}Ci 2-^{14}C-Mevalonat zugegeben. Während des ganzen Vorgangs wurden die Behälter der Nebennieren mit Eis gekühlt. Nach Verdrängen der Luftatmosphäre durch Carbogen wurden die Inkubationsgefäße bei 37^{o}C für drei Stunden in einer Warburg-Apparatur geschüttelt.

Gewinnung und Reinigung der Gesamtlipoide

Das Inkubat wurde in einem Potter-Elvehjen-Glashomogenisator zerkleinert, in die 20fache Menge Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) eingetragen und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wurde in einen Meßzylinder abfiltriert und das Filtrat mit dem 0,2fachen Volumen physiologischer Kochsalzlösung geschüttelt. Nach vollständiger Trennung der beiden Phasen wurde die wässrige obere Schicht abgesaugt und aus der unteren Phase, durch wiederholtes Auswaschen mit einer künstlichen oberen Phase (hergestellt aus 4 Teilen eines Chloroform-Methanol-Gemisches 2:1 (v/v) und einem Teil physiologischer Kochsalzlösung) sämtliche wasserlösliche Radioaktivität entfernt. Die untere Phase, mit den auf diese Weise nach Folch und Mitarbeitern (34) gereinigten Lipoiden, wurde im Rotationsverdampfer bei Badtemperaturen nicht über 40°C eingeengt, nacheinander mit absolutem Äthanol und Chloroform aufgenommen und erneut zur Trockene gebracht. Mit Chloroform wurden die Lipoide in Reagenzgläser überführt und im Trockenschrank bei 80°C eingedampft. Zur dünnschichtchromatographischen Trennung wurde der Rückstand in Chloroform gelöst auf 1mm dicke Kieselgel-G Dünnschichtplatten übertragen. Als Fließmittelsystem diente ein Petroläther-Diäthyläther-Essigsäure-Gemisch 90:10:1 (v/v/v). Die gewünschten Substanzen, Cholesterin und Cholesterinester, wurden nach der Auftrennung mit je 10 ml Chloroform-Methanol 1:2 (v/v) aus den abgeschabten Kieselgelarkaden eluiert.

Bestimmung der spezifischen Radioaktivität

Aliquote Teile der in jeweils 10 ml Chloroform-Methanol 1:2 (v/v) gelösten Cholesterinester bzw. des Cholesterins wurden in den zur Zählung vorgesehenen Gläsern eingedampft, mit Stickstoff getrocknet und in je 10 ml PPO-POPOP Szin-

tillatorlösung gelöst. Letztere enthielt 5 g PPO und 0,3 g Dimethyl-POPOP in 1 Liter Toluol. Gezählt wurde jeweils 100 Minuten in einem "Tricarb"-Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer der Firma Packard Instruments Co. (La Grange, USA) mit der Einstellung: Fenster A: 50, Fenster B: 100, Verstärkung: 7,6%. Der Cholesteringehalt wurde photometrisch nach Zak und Mitarbeiter (35) bestimmt.

Reagenzien

Alle verwendeten Lösungsmittel besaßen p.a. Qualität. Petroläther (Kp. 50-70°C) wurde von der Fa. Riedel de Haen (Seelze b. Hannover), PPO, sowie Dimethyl-POPOP von der Fa. Packard (Frankfurt am Main), Humanalbumin von den Behringwerken (Marburg), DL-2-^{14}C-Mevalonsäure (DBED Salz) von New England Nuclear Boston, Massachusets, bezogen. ACTH von der Fa. Schering AG (Berlin).
Alle anderen Chemikalien waren Produkte der Fa. Merck (Darmstadt).

ERGEBNISSE

Untersuchungen nach ACTH-Stimulierung

In den Versuchen wurden 8 Ratten jeweils 10 IE ACTH i.p. injiziert. Die Kontrolltiere wurden ohne vorherige Injektion getötet. Die intraperitoneale Injektionsweise wurde gewählt, da in der Bauchhöhle die Resorptionsdauer des zugeführten Stoffes bei wässrigen Lösungen fast der einer intravenösen Injektion entspricht.

15,30,45,60 und 180 Minuten nach der Injektion wurden die Tiere der ersten Versuchsreihe getötet. Eine zweite, unter gleichen Bedingungen durchgeführte Versuchsreihe sollte den Aussagewert der Untersuchung erhöhen. Die Abstände zwischen Injektion und Tötung betrugen hier 15,30,45,75,120 und 360 Minuten.

Innerhalb jeder Gruppe wurde die biologische Schwankungsbreite durch Standardabweichung vom Mittelwert bestimmt (36). In den Tabellen 1-14 sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengefaßt. Die Abbildungen 1-14 zeigen in graphischer Darstellung, welchen Schwankungen die Syntheseaktivität der Nebennieren und ihr Gehalt an Cholesterinestern und freiem Cholesterin unterworfen waren.

Der Gesamtcholesteringehalt fällt in der ersten Versuchsreihe innerhalb von 30 Minuten von 31,06 Gamma pro mg Frischgewicht auf 12,65 Gamma pro mg Frischgewicht, also um ca. 60 %. Nach diesem Minimum verändert sich der Cholesteringehalt bis 60 Minuten p.i. nur geringfügig. Der 3-Stunden-Wert liegt um 20 % niedriger als der Kontrollwert.

Der Gesamtcholesteringehalt der Nebennieren in der 2. Versuchsreihe fällt ebenfalls kurz nach der ACTH-Verabreichung ab. Die Verminderung beträgt aber nur 30 % des Ausgangswertes und findet sich schon 15 Minuten p.i. Danach steigt der Cholesteringehalt kontinuierlich an, bis er nach 2 Stunden sein Maximum erreicht, das ca. 15 % über dem Kontroll-

wert liegt. Nach 6 Stunden ist er auf den Minimalwert abgesunken und liegt hier 36 % unter dem Kontrollwert.

Ein sehr ähnliches Bild erhält man, verfolgt man den Gehalt der Nebennieren an Cholesterinestern (Abb. 3,4). Die 1. Versuchsreihe zeigt ebenfalls ein signifikantes Minimum bei 30 Minuten. Ebenso sind der 15-Minuten- und der 6-Stunden-Wert der 2. Versuchsreihe signifikant gegenüber dem Ausgangswert erniedrigt, das Maximum liegt 2 Stunden p.i. Ähnlich wie der Gesamtgehalt des Cholesterins verringern sich die Ester nach 6 Stunden um ca. 40 % des Kontrollwertes; der Unterschied zum Kontrollwert ist signifikant.

Die beiden Kurven (Abb.5,6), die den Gehalt der Nebennieren an freiem Cholesterin darstellen, verlaufen innerhalb der ersten 15 Minuten parallel, dann jedoch gegenläufig, wobei sich in der 1. Versuchsreihe eine signifikante Verminderung des freien Cholesterins abzeichnet, die nach 1 Stunde mit 40 % am größten ist, während in der 2. Versuchsreihe der Cholesteringehalt nach 30 Minuten etwas über den Kontrollwert hinausgeht und dann in Höhe des Ausgangswertes schwankt.

Um den Einbau des ^{14}C-Mevalonats und damit die Syntheseaktivität der Nebenniere festzustellen, wurden die Impulse pro Minute pro mg Frischgewicht und die spezifische Aktivität der Cholesterinester und des freien Cholesterins bestimmt.

Abbildung 7 und 8 zeigen, welchen Schwankungen die Syntheserate der Cholesterinester unterliegt. Beide Kurven zeigen ein signifikantes Minimum, in Versuchsreihe 1 bei 45 Minuten, in Versuchsreihe 2 schon bei 15 Minuten. 15 Minuten nach diesem Minimum ist die Syntheserate etwas angestiegen, zeigt in Kurve 2 bei 2 Stunden ein Maximum, das jedoch nicht signifikant ist und erreicht nach 6 Stunden

wieder die Höhe der Ausgangslage, während bei Kurve 1 der 3-Stunden-Wert 15 % niedriger als der Kontrollwert liegt, was aber nicht ausschließt, daß zwischen dem 1- und dem 3-Stundenwert die Syntheserate angestiegen ist.

Während sich beim freien Cholesterin der Verlauf der spezifischen Aktivität und der Impulse pro Minute pro mg Frischgewicht annähernd decken, ist dies bei den Cholesterinestern nicht der Fall. Nach 30 Minuten steigt die spezifische Aktivität in der ersten Versuchsreihe auf fast das Dreifache des Kontrollwertes. Der 45-Minuten-Wert liegt wieder im Kontrollwertbereich, ebenso der 3-Stunden-Wert. Eine mäßige Erhöhung findet sich nach 1 Stunde. Außer einem Maximum nach 6 Stunden hat die 2. Versuchsreihe keine wesentlichen Schwankungen aufzuweisen (Abb. 7,8,9,10).

Der Gehalt der Nebenniere an neusynthetisiertem freiem Cholesterin weist ebenfalls Schwankungen auf. Die Kontrollwerte liegen sehr weit auseinander, was wohl an der großen Fehlerbreite des ersten Kontrollwertes liegt. Beide Kurven verlaufen sonst aber sehr ähnlich und zeigen eine Erhöhung der Syntheseaktivität nach 2 bzw. 3 Stunden. Der Verlauf der spezifischen Aktivität weicht, wie oben schon erwähnt, kaum von dem der Syntheserate ab (Abb. 11,12,13,14).

	Kontrolle	1/4	1/2	3/4	1	11/4	2	3	6	Std.
Gamma Gesamtcholesterin pro mg Frischgewicht Nebenniere										
1	31,06	28,49	12,65	15,55	14,33			24,85		
2	35,14	24,47	29,02	36,43		37,50	40,14		22,43	
Gamma Cholesterinester pro mg Frischgewicht Nebenniere										
3	26,03	24,50	9,40	12,21	11,31			21,70		
Standardabweichung										
	6,39	4,45	1,86	2,18	4,10			4,72		
Standardabweichung in Prozent										
	24	18	19	17,8	27,5			21		
4	30,54	20,93	23,98	31,98		33,37	35,61		18,19	
Standardabweichung										
	4,27	6,8	4,4	5,3		5,15	6,35		4,45	
Standardabweichung in Prozent										
	14	30,8	18,3	16,7		15,4	17,8		24,4	
Gamma freies Cholesterin pro mg Frischgewicht Nebenniere										
5	5,03	3,99	3,25	3,34	3,02			3,15		
Standardabweichung										
	0,81	0,51	0,43	0,41	0,51			0,66		
Standardabweichung in Prozent										
	16	12	13,3	12	16,9			20,3		
6	4,60	3,54	5,04	4,46		4,13	4,53		4,24	
Standardabweichung										
	0,76	0,32	0,58	0,39		0,68	0,31		0,54	
Standardabweichung in Prozent										
	16,4	9,1	11,5	8,8		16,4	6,8		12,7	

	Kontrolle	1/4	1/2	3/4	1	11/4	2	3	6	Std.
Ipm der Cholesterinester pro mg Frischgewicht Nebenniere										
7	28,65	26,05	26,05	11,05	18,53			24,58		
Standardabweichung										
	5,50	6,23	4,25	4,00	2,66			5,19		
Standardabweichung in Prozent										
	19,1	23,9	16,3	36,0	14,0			21,0		
8	30,77	16,01	22,45	29,88		25,53	33,71		25,51	
Standardabweichung										
	3,36	2,85	15,0	8,0		4,28	8,11		4,40	
Standardabweichung in Prozent										
	10,9	17,8	66,9	26,7		16,7	24,0		17,2	
Ipm der Cholesterinester pro Gamma Cholesterinester										
9	1,19	1,08	2,88	0,96	1,61			1,16		
Standardabweichung										
	0,42	0,33	0,74	0,22	0,42			0,31		
Standardabweichung in Prozent										
	34,8	30,7	25,6	23,0	26,0			26,8		
10	1,08	0,81	0,94	0,97		0,78	0,93		1,68	
Standardabweichung										
	0,24	0,23	0,59	0,35		0,11	0,20		0,49	
Standardabweichung in Prozent										
	22,2	28,2	62,9	35,7		14,4	21,1		34,4	

	Kontrolle	1/4	1/2	3/4	1	11/4	2	3	6	Std.
Ipm des freien Cholesterins pro mg Frischgewicht Nebenniere										
11	7,25	1,71	3,14	2,30	2,29			7,35		
Standardabweichung										
	4,67	0,37	1,62	0,69	0,56			1,8		
Standardabweichung in Prozent										
	64	21,6	51,5	29	24,6			24,5		
12	3,94	4,91	4,11	4,92		4,21	9,16		5,26	
Standardabweichung										
	0,99	0,90	2,80	1,86		1,58	1,36		0,79	
Standardabweichung in Prozent										
	25,0	18,4	68,0	37,7		37,5	14,8		14,9	
Ipm des freien Cholesterins pro Gamma freies Cholesterin										
13	1,24	0,44	1,13	0,70	0,79			2,63		
Standardabweichung										
	0,60	0,11	0,64	0,23	0,25			0,77		
Standardabweichung in Prozent										
	48,0	24,7	56,5	32,8	31,3			29,0		
14	0,91	1,42	0,77	1,06		0,89	2,03		1,25	
Standardabweichung										
	0,29	0,33	0,66	0,22		0,20	0,36		0,23	
Standardabweichung in Prozent										
	31,7	23,1	85,0	20,8		22,0	17,8		18,4	

Gamma Gesamtcholesterin pro Frischgewicht Nebenniere in Milligramm

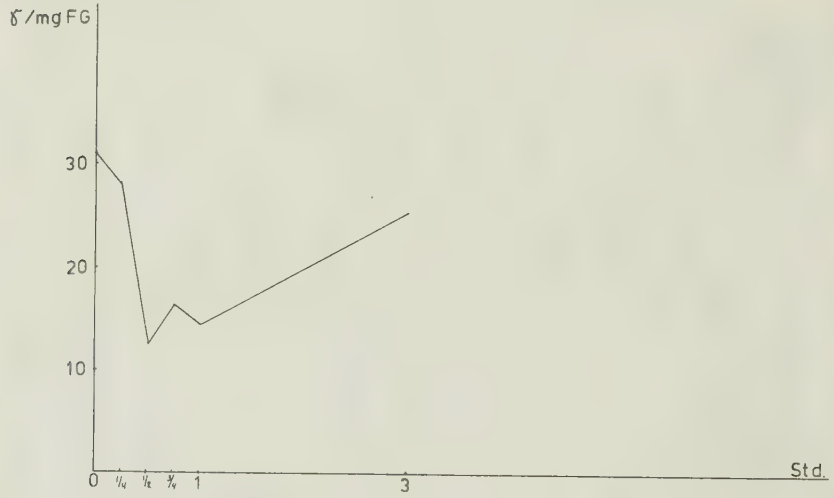

Abb.1: 1. Versuchsreihe

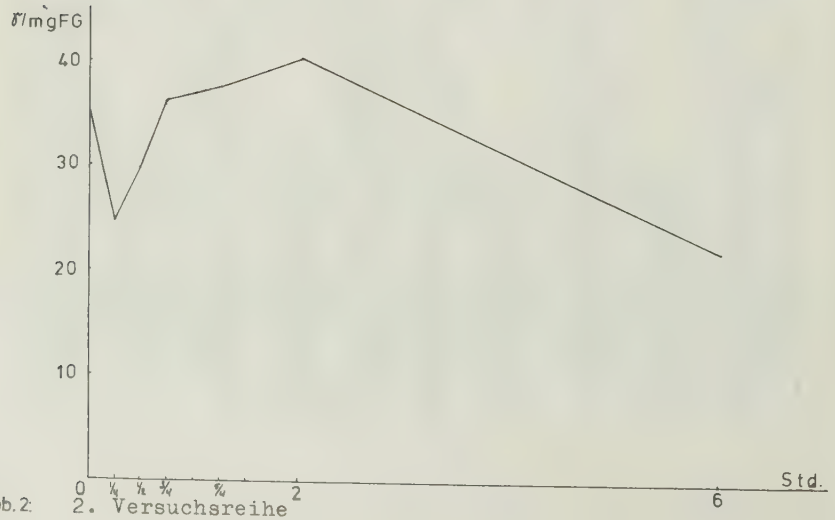

Abb.2: 2. Versuchsreihe

Gamma Cholesterinester pro Milligramm Frischgewicht Nebenniere

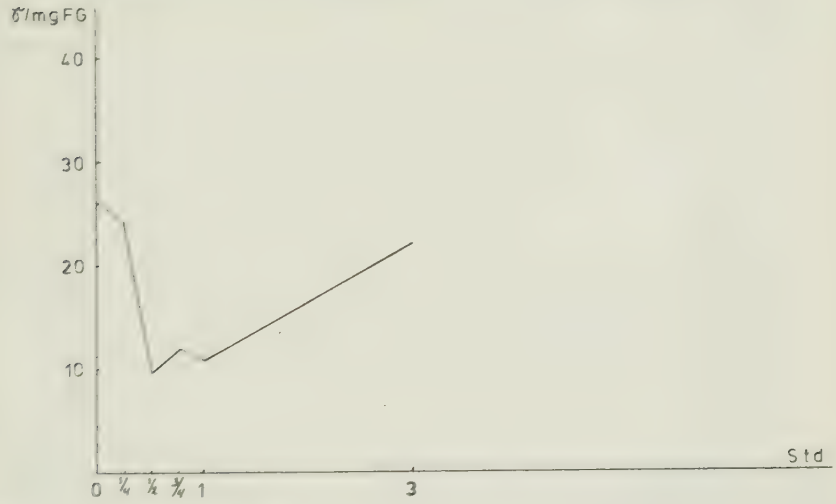

Abb. 3: 1. Versuchsreihe

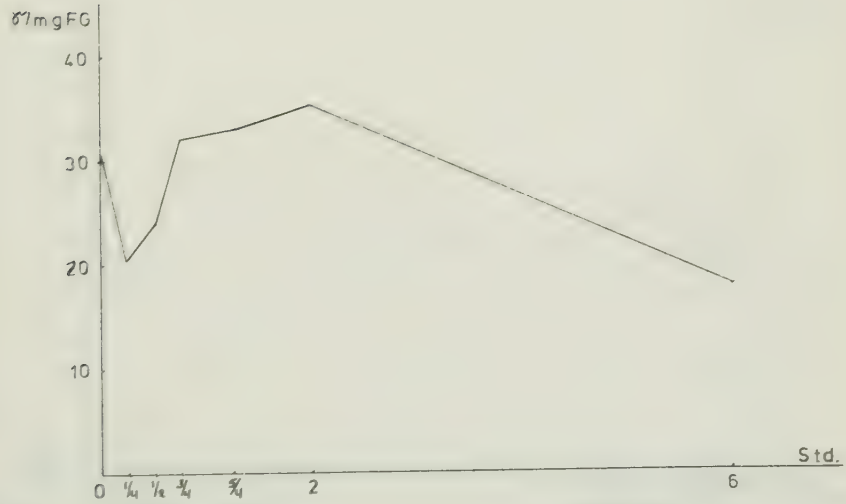

Abb. 4: 2. Versuchsreihe

Gamma freies Cholesterin pro Milligramm Frischgewicht
Nebenniere

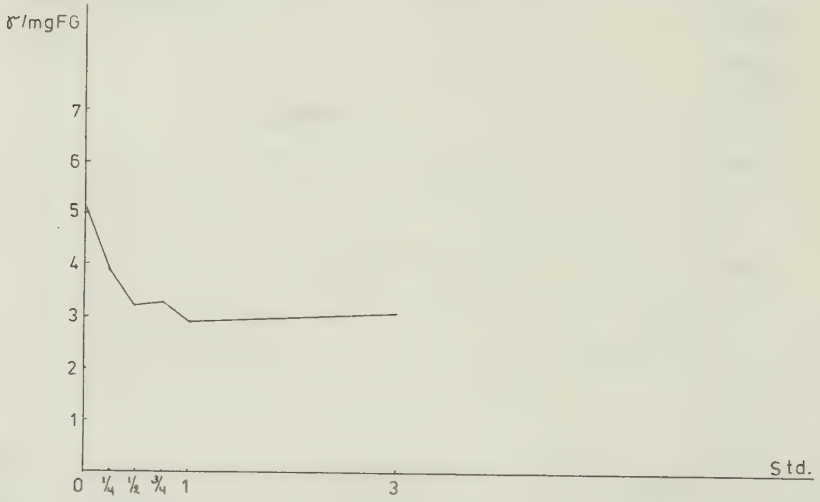

Abb.5: 1. Versuchsreihe

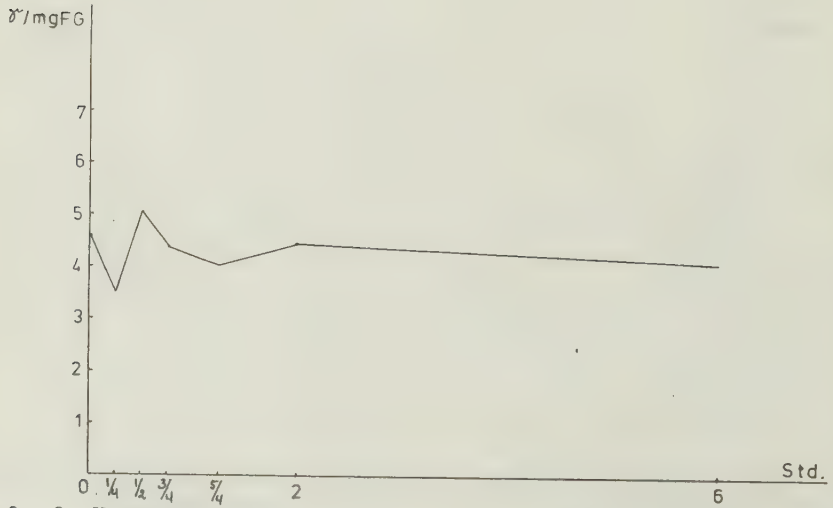

Abb.6: 2. Versuchsreihe

Ipm der Cholesterinester pro Milligramm Frischgewicht Nebenniere

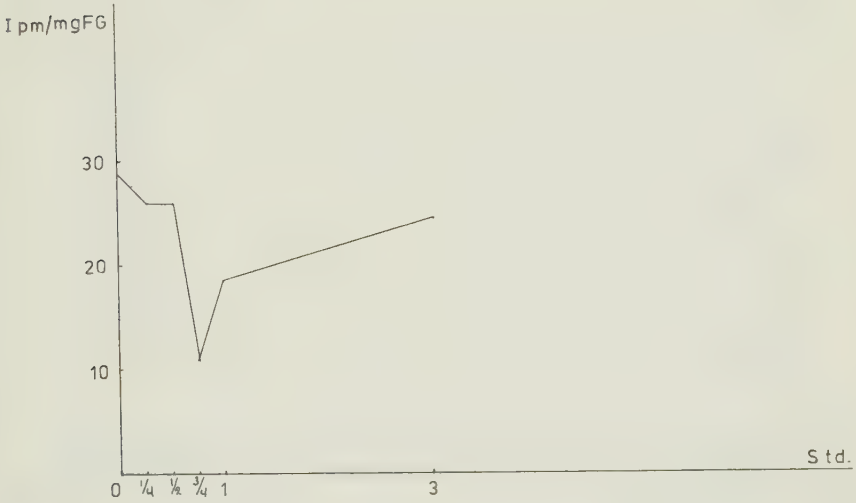

Abb.7: 1. Versuchsreihe

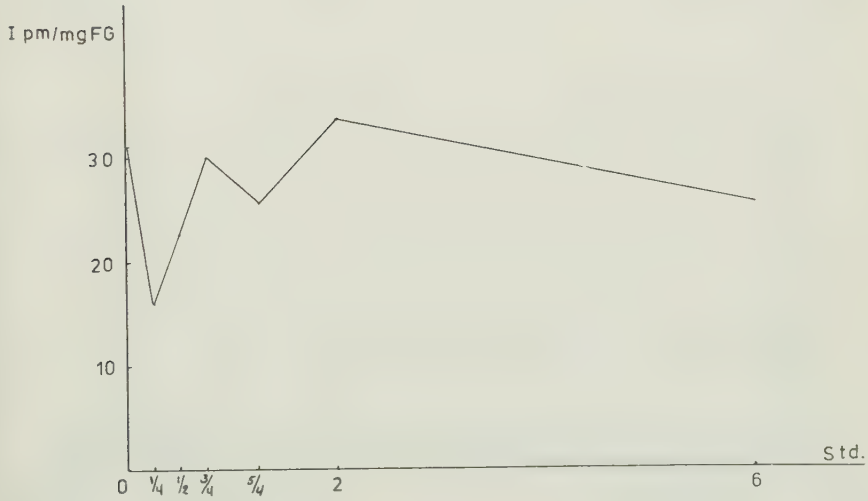

Abb.8: 2. Versuchsreihe

Spezifische Aktivität der Cholesterinester
(Ipm der Cholesterinester pro Gamma Cholesterinester)

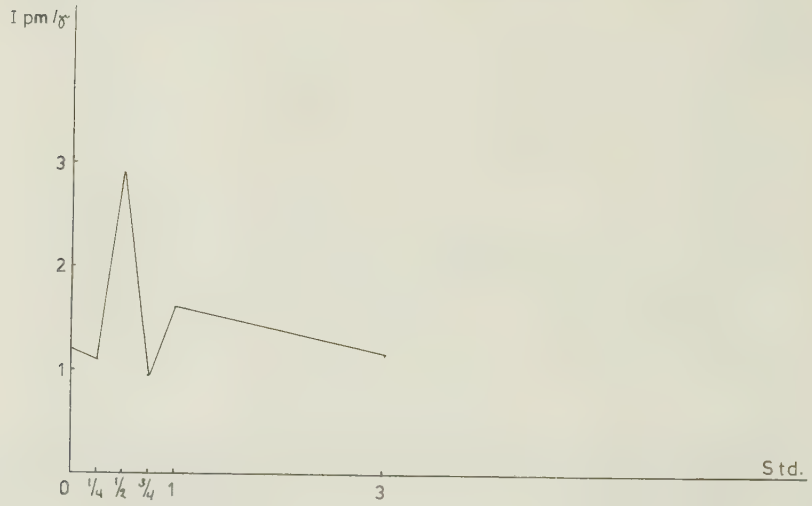

Abb.9: 1. Versuchsreihe

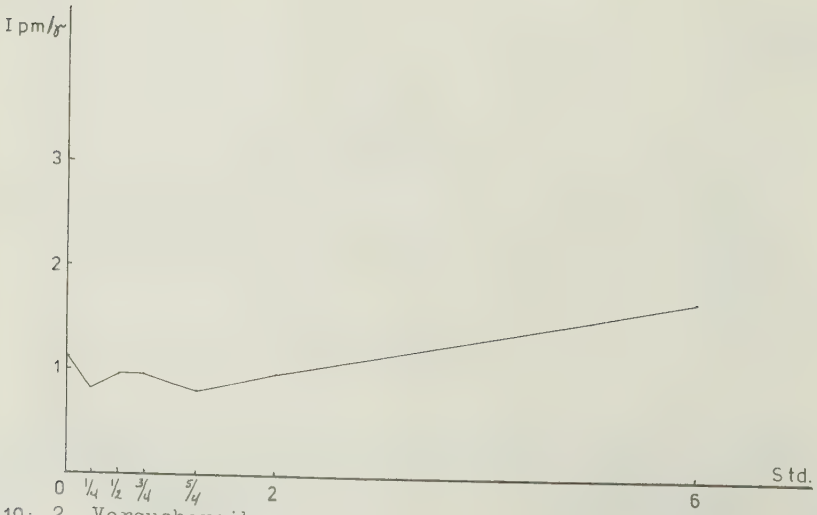

Abb.10: 2. Versuchsreihe

Ipm des freien Cholesterins pro Milligramm Frischgewicht Nebenniere

Abb.11: 1. Versuchsreihe

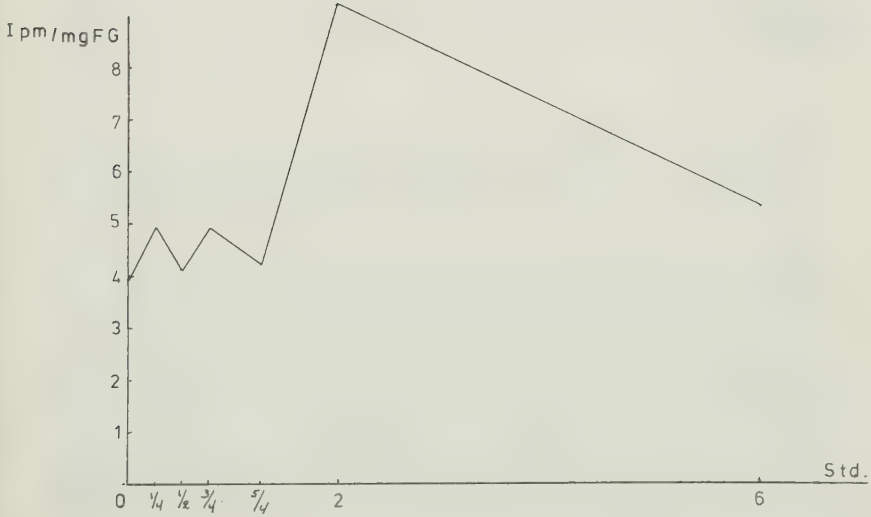

Abb.12: 2. Versuchsreihe

Spezifische Aktivität des freien Cholesterins
(Ipm des freien Cholesterins pro Gamma freies Cholesterin)

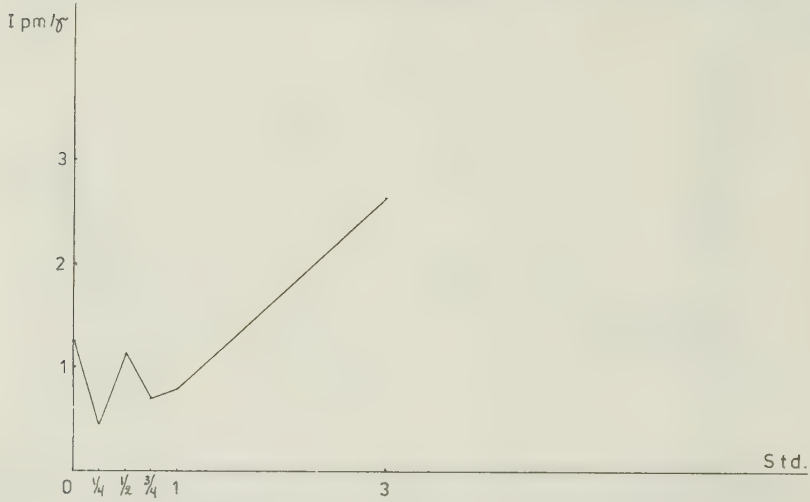

Abb. 13: 1. Versuchsreihe

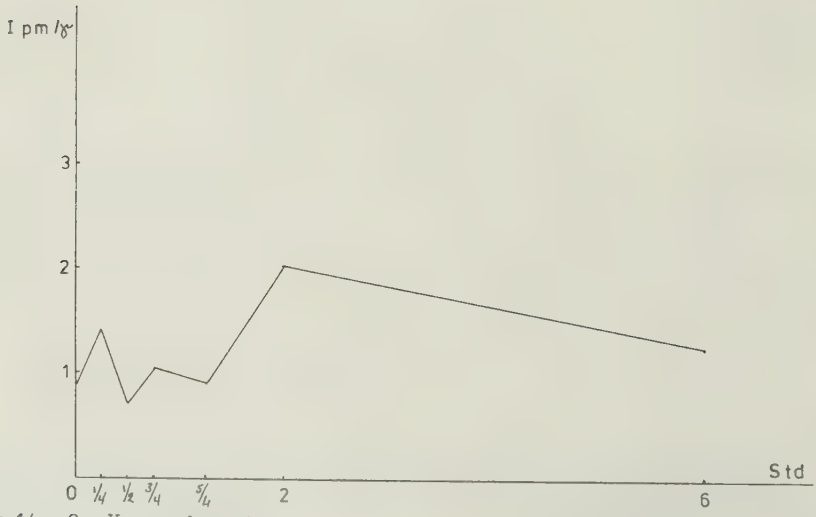

Abb. 14: 2. Versuchsreihe

DISKUSSION

In der nichtstimulierten Nebenniere der Ratte findet sich im vorliegenden Versuch ein durchschnittlicher Gesamtcholesteringehalt von etwa 3-3,5 % des Frischgewichtes. Diese Cholesterinmengen werden überwiegend in Form der Ester im Gewebe abgelagert; das freie Cholesterin macht nur etwa 1/8 bis 1/6 des Gesamtcholesterins aus. Eberhagen fand bei seinen Untersuchungen einen Gesamtgehalt von Cholesterin von 4 %, wovon etwa 1/10 aus freiem Cholesterin besteht (37).

Übereinstimmend mit Wiedemanns Untersuchungen (38), in denen als Substrat ^{14}C-Acetat verwendet wurde, zeigen die vorliegenden Ergebnisse als Folge der einmaligen Verabreichung von 10 IE ACTH ebenfalls ein Absinken des Cholesteringehaltes innerhalb der ersten und sechsten Stunde und ein Maximum beim 2-Stunden-Wert.

Für die experimentell erzeugten Schwankungen des Gesamtcholesteringehaltes sind vorwiegend die Ester verantwortlich, während der Gehalt an freiem Cholesterin zwischen dem 30-Minuten- und 6-Stunden-Wert eine auffällige Konstanz zeigt, wie das auch Eberhagen aus ähnlichen Versuchen berichtet (37).

Übereinstimmend mit Popjaks Auffassung (5) scheint es demnach möglich, die Ester als die eigentlichen Ausgangsstoffe der Hormonsynthese anzusehen.

Die Parallelität zwischen Abfall und Anstieg der Konzentration der Cholesterinester und ihrer Syntheserate spricht dafür, daß die Cholesterinspeicherung durch Synthesesteigerung hervorgerufen wird - eine gleichzeitige Anreicherung aus dem Plasma ist aber nicht auszuschließen. Diese Parallelität läßt sich beim freien Cholesterin nicht feststellen. Obwohl die Syntheseaktivität und die spezifische Aktivität zwischen einer und zwei bzw. drei Stunden beträchtlich an-

steigen, verändert sich die Konzentration des freien Cholesterins nicht in diesem Sinne.

Daß die Konstanz der Cholesterinfraktion und das Schwanken der Cholesterinesterfraktion aber nicht gegen eine Verwendung des freien Cholesterins als Vorläufer der Steroide spricht, hat Davis 1966 demonstriert (39). Seinen Ergebnissen zufolge aktiviert ACTH die Umwandlung von Cholesterinestern in freies Cholesterin. Die Fraktion des freien Cholesterins, welche ungefähr 10 % des totalen Cholesterins umfaßte, veränderte sich nach ACTH-Stimulierung nicht. Nach Verabreichung von Cycloheximid jedoch wurde die ACTH-stimulierte Umwandlung von Cholesterinestern in freies Cholesterin manifest, weil das Antibioticum die weitere Umsetzung des Cholesterins zu den Corticosteroiden blockiert.

Experimente von Vaugham (1966) zeigten, daß ACTH, das zu Rattennebennieren-Schnitten zugefügt wurde, eine Erhöhung der Aktivität der Cholesterinesterase verursacht (40). Bei den bisherigen Stimulierungsversuchen der Nebenniere mit ACTH konnte immer festgestellt werden, daß die Cholesterinesterfraktion in den ersten Stunden nach der Hormongabe abnimmt.

Wie eingangs schon erwähnt, hatten die Untersuchungen Daileys (9,10) ergeben, daß der Syntheseweg zu den Steroiden durchaus auch ohne Mitbeteiligung der Cholesterinester direkt vom freien Cholesterin aus erfolgen könnte, zumal Nebennierenhomogenat vom Schwein Cholesterinester weder in Cholesterin noch in Kortikoide umzuwandeln vermochten. Andererseits sprechen Eberhagens Versuche (37) gegen eine Funktion der Cholesterinester als bloße Speicherform des Cholesterins.

Auf die Frage, welche der beiden Substanzen als unmittelbarer Vorläufer der Steroide anzusehen ist, ist also noch keine befriedigende Antwort zu geben.

Weiterhin stellt sich die Frage nach den Regulationsmechanismen der Cholesterinsynthese. Die meisten Untersuchungen darüber wurden an Lebern vorgenommen, und es scheint diesem Organ in der Regulation des Cholesterinstoffwechsels eine Sonderstellung zuzukommen. Dietschy untersuchte 1967 an 17 Organen der Ratte den Effekt von Cholesterinfütterung und Fasten auf die Steroidsynthese (41). Während in der Leber die Syntheserate merklich erniedrigt war, änderte sie sich in allen anderen untersuchten Organen nicht.

In den vorliegenden Versuchen findet sich, abweichend von Wiedemanns Ergebnissen (38), die ^{14}C-Acetat als Substrat verwendete, keine Zunahme des Gesamtcholesteringehaltes innerhalb der ersten halben Stunde, was wohl auf die ebenfalls fehlende Steigerung der Syntheseaktivität zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen ist. Während nämlich Wiedemann 30 Minuten nach ACTH-Injektion für die Cholesterinsynthese Werte findet, die um das 10fache über dem Ausgangsniveau liegen, führte bei den vorliegenden Versuchen die Stimulierung zu einer ausgeprägten initialen Hemmung der Cholesterinsynthese, die sich vor allem in der Cholesterinesterfraktion manifestierte. Ein Anstieg der Syntheseleistung fand sich erst nach 2 bzw. 3 Stunden.

Wie Siperstein 1966 zeigen konnte, werden Zu- und Abnahme der Geschwindigkeit der Cholesterinsynthese durch Änderungen der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase herbeigeführt, die die Umwandlung von HMG in Mevalonat katalysiert (30). Wie schon eingangs erwähnt, reagiert die Leber bei Cholesterinfütterung mit einer Hemmung, bei Cholesterinentfernung aus dem Körper mit einem Anstieg der Cholesterinsynthese.

Die vorliegenden Versuche sprechen dafür, daß das Mevalonat in der Nebenniere die gleichen Fähigkeiten besitzt, wie das Cholesterin in der Leber, nämlich entweder direkt oder

über eine Vermittlersubstanz, eine negative feedback-Regulation auszulösen. Um den Ort der Regulation bestimmen zu können, wäre es notwendig, dieselben Versuche statt mit ^{14}C-Mevalonat mit ^{14}C-HMG-CoA durchzuführen.

Eine weitere Möglichkeit, die niedrige Radioaktivität der Cholesterinester pro mg Frischgewicht zu deuten, wäre, daß durch die ACTH-Gabe die Umwandlung des neugebildeten Estercholesterins in Steroide sofort aktiviert würde, so daß das neusynthetisierte Cholesterin nicht augenfällig in Erscheinung tritt. Dafür würde die in der 1. Versuchsreihe aufgetretene Zunahme der spezifischen Aktivität der Cholesterinester 30 Minuten nach Versuchsbeginn sprechen.

Die erwähnte Zunahme der spezifischen Aktivität und die gleichzeitige Abnahme der Aktivität pro mg Frischgewicht sind ebenfalls ein Argument dafür, daß die Steroide aus dem verestert vorliegenden und nicht aus dem freien Cholesterin synthetisiert werden.

Ob die HMG-CoA-Reduktase das einzige Enzym ist, das für die Regulation der Cholesterinsynthese eine Rolle spielt, ist nicht ganz klar, da, wie Bucher und Gould (32,33) berichten, eine oder mehrere Schritte auf diesem Syntheseweg ebenfalls signifikanten Aktivitätsveränderungen unterliegen, die parallel zu jenen der Reduktase verlaufen. Cholesterinfütterung senkt nicht nur die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase auf sehr niedrige Werte, auch die Umwandlungsgeschwindigkeit von Mevalonat in Cholesterin wird auf ca. 20 % der Kontrollwerte gesenkt.

Bucher (32) untersuchte 1959 die Kapazität der Synthese von Cholesterin aus ^{14}C-Acetat, ^{14}C-Mevalonsäure und ^{14}C-Squalen von Rattenlebern nach Bestrahlung, Fasten und Verabreichung von cholesterinreicher Diät. In jeder experimentellen Gruppe wurden weite Abweichungen vom Normalspiegel in allen Abschnitten des Reaktionsablaufes gefun-

den. Aber die extremen Abweichungen erschienen vor dem Punkt, an dem die Mevalonsäure in den Reaktionsablauf eintrat, und sie überwogen jene, die später auftraten.

Die vorliegende Untersuchung spricht dafür, daß auch in der Nebenniere die HMG-CoA-Reduktase nicht das alleinige regulierende Enzym der Cholesterinsynthese ist. Die Syntheseaktivität der Nebenniere wird hier viel langsamer und bei weitem nicht so ausgeprägt gesteigert als dies bei Wiedemanns Untersuchungen (38) der Fall war. Dies führt zu dem Schluß, daß entweder ein oder mehrere zusätzliche regulierbare Schritte auf dem Weg zum Cholesterin existieren, die aber verzögert und nicht in dem Maße wie die HMG-CoA-Reduktase aktiviert werden.

Wie aus Buchers Untersuchungen (32) hervorgeht, ist der Reaktionsablauf vor Eintritt der Mevalonsäure in die Synthesekette viel stärker zu beeinflussen, so daß es fraglich erscheint, ob die Regulierbarkeit späterer Syntheseschritte überhaupt eine physiologische Rolle spielt.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Ratten wurden 10 IE ACTH intraperitoneal injiziert und die zu verschiedenen Zeiten nach dieser Behandlung entnommenen Nebennieren mit 2-^{14}C-Mevalonat inkubiert. Zur Untersuchung der Cholesterinester und des freien Cholesterins wurden die Lipoide dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

2. Für die experimentell erzeugten Schwankungen des Gesamtcholesteringehaltes sind hauptsächlich die Ester verantwortlich.

3. Auf die Frage, welche der beiden Substanzen als unmittelbarer Vorläufer der Steroide anzusehen ist, ist keine befriedigende Antwort zu geben.

4. ACTH-Applikation führte bei Verwendung von 2-^{14}C-Mevalonat als Substrat zu einer ausgeprägten initialen Hemmung der Cholesterinsynthese, die sich vor allem in der Cholesterinesterfraktion manifestierte. Ein Anstieg der Syntheseleistung fand sich erst nach 2 bzw. 3 Stunden.

5. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß, ähnlich wie in der Leber, auch Reaktionsschritte nach dem Eintreten von Mevalonsäure in die Synthesekette reguliert werden können. Allerdings ist es fraglich, ob dies eine physiologische Rolle spielt.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) Rosenheim,O.,u.M.C.Tebb:J.Physiol.(London)38,Proc.Liv.1909
(2) Hechter,O.,Zaffaroni,A.,u.G.Pincus:J.Amer.Chem.Soc.73, 1390(1951)
(3) Cushman jr.,P.,C.Dickson,u.J.G.Hilton:J.Clin.Invest. 43,1270(1964)
(4) Sayers,G.,M.A.Sayers,T.Y.Linag,u.C.N.H.Long:Endocrinology 38,1(1946)
(5) Popjak,G.J.:J.Path.Bact.56,485(1944)
(6) Dailey,R.E.,L.Swell,H.Field,jr.,u.C.R.Treadwell:Proc. Soc.exptl.Biol.Med.105,4(1960)
(7) Grant,J.K.:Symp.Biochem.Soc.18,24(1960)
(8) siehe (6)
(9) Dailey,R.E.,L.Swell,U.R.C.Treadwell:Arch.Biochem.99,334 (1962)
(10) Dailey,R.E.,L.Swell,u.C.R.Treadwell:Arch.Biochem.100, 360(1963)
(11) Dailey,R.E.,L.Swell,u.C.R.Treadwell:Proc.Soc.Exptl. Biol.Med.110,571(1962)
(12) Fukuda,H.:Arch.Japan.Chir.34,529(1965)
(13) Muraoka,R.:Arch.Japan.Chir.34,35(1965)
(14) Ichii,S.,u.Kobayashi,S.:Endocrin.Japan.13(I),39(1966)
(15) Peron,F.,Biochem.Biophys.Acta82,125(1964)
(16) Gould,R.G.,u.C.B.Taylor:ibid.9,179(1950)
(17) Van Bruggen,J.T.,et al.:J.Biol.Chem.196,389(1952)
(18) Tomkins,G.M.,et al.:ibid.199,543(1952)
(19) Wright,L.P.,E.L.Cresson,H.R.Skeggs,G.D.E.Mac Rae, C.H.Hoffman,D.E.Wolf,K.Folkers:J.Amer.Chem.Soc.78, 5273(1956)
(20) Tavormina,P.A.,M.H.Gibbs,u.J.W.Huff:J.Amer.Chem.Soc. 78,4498,(1956)
(21) siehe (16)
(22) Bucher,N.L.R.,et al.:J.Biol.Chem.234,262(1959)
(23) Frantz,I.D.,jr.,u.B.T.Hinkelman:J.exp.Med.101,225(1955)
(24) Tomkins,G.M.,et al.:J.Biol.Chem.201,137(1953)
(25) Langdon,R.G.,u.K.Bloch:ibid.202,77(1953)
(26) Frantz,I.D.,jr.,et al.:ibid.206,465(1954)

(27) Sakakida,h.,et al.:J.Clin.Invest.42,1521(1963)
(28) Bhattathiry,E.P.M.,u.M.D.Siperstein:ibid.42,1613(1963)
(29) Swell,L.,et al.,Science125,1194,(1957)
(30) Siperstein,M.D.,u.V.M.Fagan:J.Biol.Chem.241,602(1966)
(31) Bucher,N.L.R.,P.Overath,F.Lynen,Biochem.Biophys.Acta 40,491(1960)
(32) Bucher,N.L.R.,et al.,J.Biol.Chem.234,262(1959)
(33) Gould,R.G.,u.E.A.Swyryd,J.Lipid.Res.7,698(1967)
(34) Folch,J.,M.Lees,u.G.H.S.Stanley:J.Biol.Chem.226,497(1957)
(35) Zak,B.,N.Moss,A.Y.Boyle,u.A.Zlatkis:Anal.Chem.26,776(1954)
(36) Richterich,R.:Klin.Chemie, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a. Main, S.32(1965)
(37) Eberhagen,D.:Untersuchungen zur Beeinflussung des Lipoidstoffwechsels in den Nebennieren von Ratten, Habilitationsschrift, München 1966
(38) Wiedemann,B.,In vitro-Untersuchungen zur Beeinflussung des Lipoidstoffwechsels in Nebennieren von Ratten nach ACTH-Behandlung, Dissertation, München 1971
(39) Davis,W.W.,u.L.D.Garren:Biochem.biophysic.Res.Commun. 24,805(1966)
(40) Vaugham,M.,Usard,M.,Steinber,D.,personal communications with Davis, siehe (39)
(41) Dietschy,J.M.,J.Lipid.Res.8,97(1967)

LEBENSLAUF

Am 8.6.1946 wurde ich in Inning am Ammersee geboren. Meine Eltern sind Ludwig Schamberger und seine Ehefrau Margarethe, geb. Gilch.

Von 1952 bis 1959 besuchte ich die ersten 7 Klassen der Volksschule in Breitbrunn am Ammersee, dem ständigen Wohnsitz meiner Eltern. Anschließend besuchte ich die beiden ersten Klassen des 3jährigen Zugs der Realschule in München-Pasing. 1961 trat ich in die 9. Klasse des neusprachlichen Zweigs des Elsa-Brandström-Gymnasiums ein und legte 1966 dort die Reifeprüfung ab.

Mit dem Wintersemester 1966/67 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität München, bestand nach zwei Semestern das Vorphysikum, nach fünf Semestern das Physikum und legte, ebenfalls in München, im Frühjahr 1972 das medizinische Staatsexamen ab.

Seit dem 22.5.1971 bin ich mit Rudolf Groenewolt verheiratet.